

Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae)

Maureen Leyva¹, María del Carmen Marquetti¹, Juan E. Tacoronte², Ramón Scull³, Olinka Tiomno², Antonio Mesa², Domingo Montada¹

¹Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), Ciudad de La Habana, Cuba. ²Centro de Investigaciones e Ingenierías Químicas (CIIQ), Ciudad de La Habana, Cuba. ³Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), Ciudad de la Habana, Cuba

RESUMEN

Introducción. La acción larvicida que poseen los aceites esenciales de plantas y sus derivados los hace candidatos para ser usados como alternativas en el control de *Aedes aegypti*.

Objetivo. Determinar la acción insecticida de aceites esenciales contra larvas de *Aedes aegypti*.

Materiales y Métodos. Los bioensayos se realizaron según metodología de la Organización Mundial de la Salud. La lectura de la mortalidad se realizó a las 24 horas. Para el procesamiento de los datos se utilizó el programa Probit-Log, el cual nos brinda las CL_{50} y CL_{95} además de la ecuación de la línea de regresión. Se utilizó una prueba de χ^2 para comparar las dosis y las mortalidades obtenidas, además de comparar las pendientes de las rectas entre sí.

Resultados. Los aceites probados presentaron alta actividad insecticida contra *Aedes aegypti*, siendo *Piper auritum* el que presentó mayor actividad con la menor CL_{50} ($CL_{50}=0.0017$), seguido por *Pimenta racemosa* ($CL_{50}=0.0027$), *Chenopodium ambrosioides* ($CL_{50}=0.0035$) y *Piper aduncum* ($CL_{50}=0.0057$). Los valores de χ^2 demostraron que las mortalidades obtenidas con cada uno de los aceites están asociadas con las dosis utilizadas. Al aplicarles un análisis de χ^2 a los valores de pendientes se encontró diferencia significativa entre ellas, lo que nos indica que dichos aceites poseen una respuesta diferente para la misma cepa.

Conclusiones. Estos resultados sugieren la utilización potencial de estos cuatro aceites esenciales para el control de *Aedes aegypti*, siendo el aceite de *P. auritum* el más recomendado por poseer la más alta actividad insecticida y la menor CL_{50} .

Palabras clave: Aceites esenciales, actividad insecticida, *Aedes aegypti*, Diptera, Culicidae

ABSTRACT

Larvicidal Activity of Plant Essential Oils towards *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae)

Introduction. The larvicidal activity of plant essential oils and their derivatives makes possible to use them as candidates for an alternative control method against *Aedes aegypti* larvae.

Objective. To determine the larvicidal activity of four essential oils extracted from widely-spread plants in Cuba against *Aedes aegypti* larvae.

Materials and Methods. Larvicidal bioassays were carried out according to the methodology recommended by the World Health Organization. Mortality reading was recorded after 24 h of exposure. Data were processed by means of the Probit-Log software, which provides LC_{50} and LC_{95} values, in addition to the equation for the regression line. A χ^2 test was used to compare the relationship between dosages and mortality values obtained as well as to compare the slope of regression lines.

Solicitud de sobretiros: Ing. Maureen Leyva Silva, Departamento Control de Vectores, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½, Apartado 601, La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba. FAX: 53-7-2046051 y 53-7-2020633. E-mail: maureen@ipk.sld.cu

Recibido: el 20 de noviembre de 2008. **Aceptado para publicación:** el 26 de marzo de 2009

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb092012.pdf>

Leyva *et al.*

Results. The essential oils tests showed a high larvicidal activity on *Aedes aegypti*. *Piper auritum* essential oil showed the highest larvicidal activity with the lowest $CL_{50}=0.0017$ value, followed by *Pimenta racemosa* ($LC_{50}=0.0027$ value), *Chenopodium ambrosioides* ($LC_{50}=0.0035$ value) and *Piper aduncum* ($LC_{50}=0.0057$ value). Values for χ^2 demonstrated that the mortalities produced by each essential oil are associated to the dosages used. When applying the χ^2 analysis to the slope values, a significant difference was found, which indicates that the essential oils have a different effect to the same strain.

Conclusion. These results suggest a potential use of the four essential oils tested to control *Aedes aegypti*, from which, *P. auritum* oil is the most recommended as it showed high larvicidal activity and low CL_{50} .

Key words: Essential oils, larvicidal activity, *Aedes aegypti*, Diptera, Culicidae

INTRODUCCIÓN

La reducción de los criaderos de *Aedes aegypti* y los programas de saneamiento ambiental son componentes importantes dentro de las estrategias trazadas para el control de este vector; sin embargo, no han sido suficientes para disminuir sus índices de infestación; por tal motivo, durante estos últimos 40 años, el control del mosquito se ha logrado principalmente por métodos químicos (1-2).

La presión de selección ejercida por los insecticidas ha dado lugar al desarrollo generalizado de resistencia en *Aedes aegypti* (3). Por esta razón, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha replanteado el uso de los recursos disponibles en cada territorio, para adecuarlos como medidas en el control de vectores (4). Algunos de estos recursos suelen ser los extractos de plantas, ya que éstos constituyen una herramienta alternativa dentro del manejo integrado de vectores (5).

En la actualidad, se ha reportado acción larvicida de especies de plantas contra insectos vectores de los géneros *Culex*, *Anopheles*, y de

las especies *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* (6-23). Además, existe un número variado de metabolitos secundarios que se encuentran en la composición mayoritaria de las plantas, a los cuales se les adjudican las propiedades insecticidas (24-29).

En Cuba se presenta una gran biodiversidad florística con especies endémicas y no endémicas, pertenecientes a las familias *Myrtaceae*, *Pinaceae* y *Piperaceae*, que poseen acción insecticida potencial. Hasta nuestros días, algunas especies de estas familias han sido comprobadas contra plagas de la Salud Pública, como *Blattella germanica*, *Musca domestica* y *Ae. aegypti* (30-35).

Los aceites esenciales de *Piper auritum*, *Piper aduncum* y *Chenopodium ambrosioides* provienen de plantas que no son endémicas, pero que están ampliamente distribuidas en Cuba, y no se ha comprobado su acción insecticida en plagas de la Salud Pública. *Pimenta racemosa*, aunque posee acción insecticida, igualmente no ha sido evaluada en *Ae. aegypti*. El objetivo de este trabajo es determinar la acción insecticida de estos aceites esenciales contra larvas de *Ae. aegypti*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de los aceites

Los aceites esenciales de *P. racemosa* y *P. aduncum* fueron extraídos de hojas recién colectadas en poblaciones de la región de Viñales, Pinar del Río, a 156 km de la Habana, Cuba. La extracción fue realizada mediante el método de hidrodestilación.

Los aceites de *P. auritum* y *Ch. ambrosioides* fueron obtenidos de plantas recién colectadas en la última fase vegetativa (8-12 meses), de viveros experimentales adjuntos al Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana. Fueron extraídos por el método de destilación por arrastre con vapor, utilizando un equipo Clevenger según las normas NRSP-309 (36).

Análisis cromatográfico

Los aceites fueron caracterizados por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría

Aceites esenciales como larvicidas de *Ae. aegypti*

de masa. La identificación de los componentes se llevó a cabo por comparación con los índices relativos de retención y los espectros de masa de los componentes de referencia en las dos columnas. El análisis de los componentes de cada aceite y su identificación fue por medio del índice de Kovak; su comparación se realizó con la quimioteca NIST, lo que permitió valorar la composición mayoritaria de cada aceite (**Cuadro 1**).

se replicaron 3 veces. Los bioensayos se realizaron según metodología de la OMS, 1981 (37).

Teniendo en cuenta estudios anteriores con otros aceites esenciales, se realizaron diluciones y se ensayaron concentraciones que fueron disminuyendo de 0.06% (600mg/L) hasta 0.008% (80 mg/L). La temperatura osciló entre 28 y 30°C y una HR>70%. La lectura de la mortalidad se realizó a las 24 horas.

Cuadro 1
Composición mayoritaria obtenida en el análisis cromatográfico de los aceites esenciales ensayados en larvas de *Aedes aegypti*

<i>P. racemosa</i>	<i>P. auritum</i>	<i>P. aduncum</i>	<i>C. ambrosioide</i>
4-terpineol (20.7%)	Safrol (93.24%)	Dilapiol (82.0%)	Carvacrol (24.0%)
1,8-cineol (20.4%)	Miristicina (4.34%)		α -terpineol (73.9%)
Eugenol (10.7%)			p-cimeno (4.3%)
α -terpineol (10.0%)			

Material biológico

Se utilizó una cepa susceptible de *Ae. aegypti* nombrada Rockefeller, proveniente del Centro de Control de Enfermedades de San Juan de Puerto Rico, y estabilizada en el insectario de nuestro departamento por un periodo de 10 años; su CL₉₀ para Lambdaialotrina es 0.014 ppm, para Cipermetrina 0.006 ppm y para Clorpirifos 0.012 ppm.

Los huevos de dicha cepa se colocaron a eclosionar en una bandeja con 2 litros de agua declorinada y una pizca de harina de pescado; se retiró la tira de huevos a las 12 horas, cuando las larvas eclosionaron. El agua fue cambiada diariamente para la oxigenación de las larvas; se añadió la alimentación hasta llegar a tercer estadio.

Bioensayos de laboratorio

Por cada concentración ensayada, se utilizó un control y cuatro réplicas, a las cuales se les añadió 1 ml de las soluciones preparadas del aceite (las que fueron disueltas en etanol), y fue añadido en 99 ml de agua; al control, 1 ml de etanol en el mismo volumen. Para cada concentración ensayada se utilizaron 125 larvas de tercer estadio (25 para cada frasco). Las dosificaciones por aceite

Para el procesamiento de los datos se utilizó el programa Probit-Log (Raymond, 1985) (38), el cual nos brinda las concentraciones letales que provocan las mortalidades entre 1 y 99.9%, además de la ecuación de la línea de regresión. Se utilizó un test de χ^2 para comparar las dosis y las mortalidades obtenidas, además de comparar las pendientes de las rectas entre sí.

RESULTADOS

En el **Cuadro 2** se pueden observar las concentraciones finales que provocaron entre 5 y 95% de mortalidades con cada aceite, pudiéndose corroborar la alta actividad insecticida que poseen los mismos; el aceite de *P. auritum* arrojó las menores concentraciones en los bioensayos (0.0010-0.0025%), seguido de *P. racemosa*, *Ch. ambrosioide* y *P. aduncum*. Es válido aclarar que no ocurrió muerte en los testigos.

Los datos analizados con el programa Probit-log, para obtener las concentraciones letales y las rectas de regresión para cada aceite, se muestran en el **Cuadro 3**. A todos los resultados de los bioensayos se les aplicó una prueba de χ^2 , presentando una $p < 0.05$; por lo que podemos plantear que

Cuadro 2
Concentraciones letales (CL) finales probadas y mortalidades obtenidas con los aceites esenciales de las plantas estudiadas en larvas de *Aedes aegypti*

Aceites esenciales	Concentraciones probadas	Mortalidades obtenidas (%)	Mortalidades esperadas (%)	Contribución χ^2
<i>Pimenta racemosa</i>	0.0020	28	26.44	0.1255
	0.0030	59	62.14	0.4192
	0.0040	84	83.53	0.0157
	0.0050	94	93.22	0.0953
<i>Piper auritum</i>	0.0010	5	2.04	0.465
	0.0015	23	17.72	1.1081
	0.0020	68	51.69	1.5392
	0.0025	88	68.85	3.5682
<i>Piper aduncum</i>	0.0050	25	21.37	0.7835
	0.0060	53	60.93	2.6387
	0.0070	91	88.16	0.7736
	0.0080	98	97.84	0.0876
<i>Chenopodium ambrosoide</i>	0.0030	36	34.43	0.1096
	0.0040	66	62.03	0.6684
	0.0050	84	80.39	0.8229
	0.0060	88	90.41	0.0191
	0.0070	96	95.40	0.0815

Cuadro 3
Concentraciones letales (CL), límites de confiabilidad (LC) y rectas de regresión obtenidas con los aceites esenciales ensayados en *Ae. aegypti*

Aceites		Concentraciones letales	LC 0.95	Rectas de regresión
<i>Pimenta racemosa</i>	CL ₅₀	0.0027	0.00243-0.00280	Y=5.36+5.33X p= 0.2799024
	CL ₉₅	0.0053	0.00481-0.00619	
<i>Piper auritum</i>	CL ₅₀	0.0017	0.00171-0.00184	Y=5.14+7.30 X p=0.9013375
	CL ₉₅	0.0029	0.00279-0.00324	
<i>Piper aduncum</i>	CL ₅₀	0.0057	0.0055-0.00588	Y=5.29+5.32X p=0.4406068
	CL ₉₅	0.0075	0.0072-0.00801	
<i>Chenopodium ambrosoide</i>	CL ₅₀	0.0035	0.0034-0.0037	Y= 5.44+5.68 X p=0.244919
	CL ₉₅	0.0069	0.0065-0.0070	

todas las mortalidades ocurridas en cada uno están asociadas con las dosis utilizadas. Los aceites probados presentaron alta actividad larvicida contra *Ae. aegypti*, siendo *P. auritum* el menor con una CL₅₀ = 0.0017%, de la misma forma *P. racemosa* presentó una CL₅₀ = 0.0027%, *C. ambrosioide* CL₅₀ = 0.0035% y *P. aduncum* CL₅₀ = 0.0057%. *P. auritum* mostró el valor de CL₅₀ más bajo de todos los aceites esenciales ensayados.

Si observamos en el **Cuadro 3** los valores de pendientes correspondientes a las ecuaciones de regresión (representadas en la **Fig. 1**), podemos

constatar que poseen altos valores, lo cual nos indica la homogeneidad de la población para la susceptibilidad ante estos aceites. Al aplicarles un análisis de χ^2 a dichos valores, se encontró diferencia significativa entre ellos con una $p < 0.0001$, lo que indica que dichos aceites poseen una respuesta diferente para la misma cepa.

DISCUSIÓN

Los aceites esenciales tienen un gran potencial como productos de bajo impacto en la entomofauna acompañante (39). Muchos de estos

Aceites esenciales como larvicidas de *Ae. aegypti*

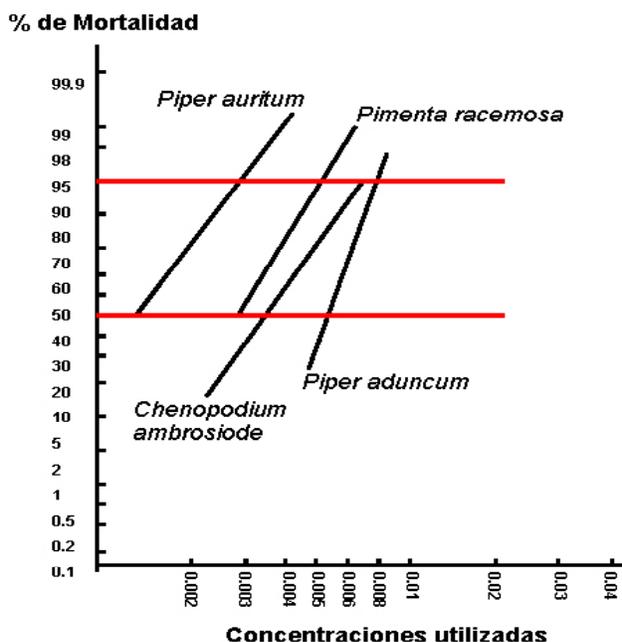


Fig. 1 Rectas de regresión obtenidas con los aceites esenciales de las plantas ensayados en larvas de *Aedes aegypti*

aceites, como el extraído de *Melia azedarach* (L), son conocidos por poseer, entre sus cualidades, actividad inhibidora de la oviposición, reguladora del crecimiento e insecticida contra *Ae. aegypti* (40). La potencialidad de los mismos varía según la especie vegetal, su origen, su composición y los mecanismos de acción contra plagas; sus componentes terpenos, alcoholes y aldehídos son los responsables de su actividad insecticida (24-29).

En el aceite esencial de *P. racemosa* se destaca la presencia mayoritaria de 4-terpineol y 1,8-cineol, que representan el 41.1% de la composición total del aceite. Otros compuestos encontrados, en menor proporción, son el eugenol y el α -terpineol. A todos estos compuestos les adjudicamos la acción insecticida de este aceite. Estudios realizados por otros autores corroboran la acción insecticida de 4-terpineol y 1,8-cineol, extraídos de otras plantas, contra diversas especies de insectos (25,29,41-42), además de eugenol y α -terpineol (43-44). En nuestros resultados, se puede observar que las dosis y las mortalidades

larvales obtenidas para *P. racemosa* contra *Ae. aegypti* son más altas (94 % de mortalidad con 50 mg/L) que las observadas en Corea del Sur (28), en cuyos estudios encontraron 100 % de mortalidad con soluciones a 25 mg/L, 52.3 % de mortalidad a 12.5 mg/L y 32.2 % a 6.25 mg/L contra *Ae. aegypti*.

Dentro de la familia *Piperaceae*, especialmente entre los miembros del género *Piper*, se ha observado acción insecticida (45-46). *Piper guineense* y *Piper nigrum* son utilizados como insecticidas y moluscicidas en diferentes partes del África (47); especies de la India como *Piper longum*, *Piper betle*, *Piper peepuloides* y *Piper cubeba* han demostrado actividad insecticida contra mosquitos y moscas (48); *Piper umbellatum* y *Piper hispidum*, nativas de América Central y el Noroeste de la Amazonia, son utilizados por las poblaciones indígenas para prevenir la malaria (49). Algunas especies como *Piper aequale*, *Piper hispidum*, *Piper reticulatum*, *Piper tuberculatum* y *Piper retrofractum* presentan una actividad significativa en el control de mosquitos del género *Aedes* (46,50). Esto se debe a que la fitoquímica de los metabolitos secundarios del género *Piper* ha revelado la presencia de compuestos como alcaloides, fenilpropanoides, lignanos, neolignanos, terpenos, flavononas, entre otros (51).

En trabajos realizados con extractos hexánicos de hoja de *P. tuberculatum*, éstos indujeron una mortalidad de 54% en larvas de segundo estadio de *Aedes atropalpus*, después de 24 horas de exposición a 100 mg/mL; los autores atribuyeron la toxicidad del extracto a la presencia de la amida isobutílica 4,5-dihidropiperlongumina, puesto que 0.01 mg/L de la sustancia pura provocó una mortalidad larval de 47% en el mismo tiempo de exposición (46).

Nuestros resultados no son similares, a pesar de que *P. aduncum* y *P. auritum* pertenecen a una misma familia, resultados que pudiesen adjudicarse al método de obtención; pero nos inclinamos por su composición química, ya que el o los componentes mayoritarios varían de una especie a

Leyva et al.

la otra, en número y en proporción. En este caso, *P. aduncum* muestra en algunos casos en su composición 82.2% de dilapiol (53); en Fiji, Nueva Zelanda, aporta 58.0% de este terpeno (54) y en Colombia *P. aduncum* revela 25.8% de dilapiol, además de 1.8 de cineol (20%) y α -pineno (55). Sin embargo, *P. auritum* muestra un alto contenido de safrol, con 93.24% como componente mayoritario, sustancia neurotóxica (56). Esta diferencia, en tipo de componente y proporción, se puede observar en nuestros resultados, debido a que *P. auritum* presenta menores concentraciones letales y mayor pendiente de la recta que *P. aduncum*, lo que demuestra la mayor toxicidad de esta planta contra larvas de *Ae. aegypti*.

En estudios anteriores realizados en Cuba (30), se comprobó la acción insecticida de *P. aduncum* en *Blatella germanica*, mientras que en México (57) no se obtuvieron mortalidades de *P. auritum* contra *Culex quinquefasciatus* con extractos al 5 y al 15%, donde se utilizó la parte aérea de las plantas.

La actividad larvicida de *Chenopodium ambrosioides* fue evaluada en *Ae. aegypti* con extractos metanólicos a diferentes concentraciones, siendo el resultado más importante la inhibición del desarrollo pupal y un incremento en el tiempo de desarrollo larval (58). También ha sido evaluada su actividad repelente en mosquitos (59) y su acción insecticida contra larvas de *Lycoriella ingenua* (60) y *Sitophilus oryzae* (61).

El efecto de UDA-245, insecticida natural a base de *Chenopodium* sp., fue evaluado en *Orius insidiosus* y *Aphidius colemani*, ambas controladores biológicos de áfidos, garrapatas y otros insectos plagas en jardinería e invernaderos. Dicho producto es utilizado como insecticida; pero en estas especies no ejerció ningún efecto en la puesta de huevos, ni en la eclosión de las larvas; la CL_{50} encontrada en el estudio excede el doble de lo recomendado por el fabricante para su uso, es decir, este producto no afectó la fauna acompañante y, por tanto, a estos controladores biológicos, por lo que fue bastante específico

(62). *Ch. ambrosioides* posee como uno de sus componentes mayoritarios el carvacrol, reportado en la literatura como terpeno insecticida (63-64), aunque a la concentración de 0.04% solubilizado en agua no demostró mortalidad contra larvas de *Ae. aegypti* (6).

Actualmente, nuestro laboratorio trabaja en la evaluación de la actividad insecticida de terpenos aislados, como el carvacrol, α -pineno y terpineol, contra *Ae. aegypti* y *Culex quinquefasciatus*.

Es una tendencia, en la actualidad, aislar compuestos que forman parte de la composición de los aceites esenciales, evaluarlos por sí solos y compararlos con el aceite mismo (25,29,41-44,46,65). Por otra parte, existen partidarios de la utilización del aceite completo y no de las fracciones aisladas, ya que otros metabolitos, aunque en menor proporción, ejercen acción sinérgica letal contra el insecto; además, el porcentaje de dichos metabolitos puede variar, según la época del año en que se colecte, la forma en que se haga y el método de extracción. El tamaño del mercado, la relación costo-beneficio y la competencia con los insecticidas sintéticos son los principales obstáculos que deben enfrentar los productos naturales en la integración de un programa de control. Los insecticidas de origen natural constituyen opciones desde el punto de vista ecológico; lo ideal es tener en ellos un uso complementario que incremente la sostenibilidad de las actuales estrategias del control integrado de plagas.

REFERENCIAS

1. OPS. Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas. Guía para su control. Publicación Científica 548. 1995; p. 109
2. Rose R. Pesticide and Public health: Integrated methods of mosquito management. Emergent Infect Dis 2001; 7: 17-23.
3. Montada D, Calderón I, Leyva M, Figueredo D. Niveles de susceptibilidad de una cepa de *Ae. aegypti* procedente de Santiago de Cuba ante los insecticidas Lambadacialotrina, Cipermetrina y Clorpirifos. Rev Cub Med Trop 2007; 59. Disponible en <http://blue/bvs1/rcmt/2007/v59n1/mtr08107.htm>.
4. OPS. Situación de los programas de Malaria en las

Aceites esenciales como larvicidas de *Ae. aegypti*

- Américas. Bol Epid Org Pan Salud. 2001; 22:10-14
5. **Padin S, Ricci E, Kahan A, Re M, Henning C.** Comportamiento repelente del aceite esencial de *Laurus nobilis* L sobre *Brevicoryne brassicae* L y *Myzus persicae* Sulz (Homoptera: Aphididae) en trigo. Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Río Cuarto, Córdoba. 26, 27 y 28 de Junio de 2002. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agrarias, Córdoba, Argentina. p. 54.
 6. **Carvalho AF, Melo VM, Carveiro AA, Machoo MI, Beantim MB, Rabelo EF.** Larvicidal activity of the essential oil for *Lippia sidoides* against *Aedes aegypti*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98:569-71.
 7. **Cheng SS, Chang HT, Chang ST, Tasai KH, Chen WJ.** Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Ae. aegypti* larvae. Bioresour Technol 2003; 89:99-102
 8. **Tare V, Deshpade S, Sharma RN.** Susceptibility of two different strains of *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) to plants oils. J Econ Entomol 2004; 97:1734-6.
 9. **Cavalcanti ES, Morais SM, Lima MA, Santana EW.** Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Ae. aegypti*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99:541-4.
 10. **Albuquerque MR, Silveira ER, De Ochoa DE, Lemus TL, Souza EB, Santiago GM, et al.** Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils from *Eupatorium bentonicaea* (DC) Baker (Asteraceae) J Agric Food Chem 2004; 52:6708-11.
 11. **Cheng SS, Liu JY, Tasai KH, Chen WJ, Chang ST.** Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloem* provenances. J Agric Food Chem 2004; 52:4395-400.
 12. **Thomas TG.** Mosquito larvicidal properties of essential oil of indigenous plant *Ipomoea airica* L. Jpn J Infect Dis 2004; 57:176-7.
 13. **Faley DH, Frances SP.** Laboratory evaluation of coconut oil as a larvicide for *Anopheles farauti* and *Culex annulirostris*. J Am Mosq Control Assoc 2005; 21:477-9.
 14. **De Mendoca FA, Da Silva KF, Dos Santos KK, Ribeneiro Junior KA, Sant'Ana AE.** Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Ae. aegypti*. Fitoterapia 2005; 76:629-36.
 15. **Prajapati V, Tripathi AK, Aggarwall KK, Kanuja SP** Insecticidal repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *An. stephensi*, *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*. Bioresour Technol 2005; 96:1749-57.
 16. **Dharmagada VS, Naik SN, Mittal PK, Vasudevan P.** Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species Bioresour Technol 2005; 96:1235-40.
 17. **Amer A, Methlhorn H.** Larvicidal effects of various essential oils against, *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* larvae (Diptera: Culicidae). Parasitol Res 2006; 99:466-72
 18. **Morais SM, Cavalcanti ES, Bertini LM, Oliveira CL, Rodríguez JR, Cardoso JH.** Larvicidal activity of essential oils from Brazilian Croton species against *Ae. aegypti*. J Am Mosq Control Assoc 2006; 22:161-4.
 19. **Ravi K, Bhavani K, Sita Devi P, Rajaswara Rao BR, Janarahan RK.** Composition and larvicidal activity of leave and stem essential oil of *Chloroxylon swetenia* against *Ae. aegypti* and *An. stephensi*. Bioresour Technol 2006; 97:24-31.
 20. **Cetin H, Yani A.** Study of the larvicidal activity of *Origanum* (Labiatae) species from Southwest Turkey. J Vector Ecol 2006; 31:118-22.
 21. **Pushpanathan T, Jebanesan A, Govindarajan M.** Larvicidal, ovicidal and repellent activities of *Cymbopogon citratus* Stapf (Graminae) essential oil against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae). Trop Biomed 2006; 23:208-12.
 22. **Byeoung-Soo P, Won-Sik C, Jeong-Han K, Kap-Ho K, SPNG-Eun L.** Monoterpenes from Thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. J Am Mosq Control Assoc 2005; 21:80-83
 23. **Pitasawat B, Champakaew D, Choochote W, Jitpakdi A, Chaithong U, Kanjanapothi D, et al.** Aromatic plant-derived essential oil: An alternative larvicide for mosquito control. Fitoterapia 2007; 78:205-10.
 24. **Karr LL, Cotas JR.** Insecticidal properties of d-limonene. J Pest Sci 1998; 13:287-90
 25. **Araujo EC, Silveira ER, Lima MA, Neto MA, de Andrade IL, Lima MA.** Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martisii* Benth. J Agric Food Chem 2003; 51:3260-2.
 26. **Carvalho AF, Melo VM, Carveiro AA, Machoo MI, Beantim MB, Rabelo EF.** Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* against *Aedes aegypti*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98:569-71.
 27. **Panella NA, Dolan MC, Karchesy JJ, Xiong Y, Peralta-Cruz J, Khasawneh M, et al.** Use of novel compounds for pest control: insecticidal and acaricidal activity of essential oils components from heartwood of Alaska yellow cedar. J Med Entomol 2005; 42:352-8.
 28. **Hoi-Seon Lee.** Mosquito larvicidal activity of aromatic medicinal plant oils against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens* J Am Mosq Control Assoc 2006; 22: 292-295.
 29. **Lucia A, González Audino P, Saccacini E, Licastro S, Zerba E, Masuh H.** Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Ae. aegypti* larvae J Am Mosq Control Assoc 2007; 23:293-303

Leyva *et al.*

30. **Aguilera L, Tacoronte JE, Leyva M, Navarro A, Bello A, Marquetti MC.** Actividad biológica del aceite esencial de *Eugenia melanadenia* (Familia: Myrtaceae) sobre *Blattella germanica* (Diptera: Blattellidae) Memorias del Congreso Latinoamericano de Etnomedicina. 2001
31. **Aguilera L, Navarro A, Tacoronte JE, Leyva M, Marquetti MC.** Efecto letal de Myrtaceas cubanas sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Rev Cub Med Trop 2003; 55:100-4
32. **Aguilera L, Tacoronte JE, Navarro A, Leyva M, Bello A, Cabrerías MT.** Composición química y actividad biológica del aceite esencial de *Eugenia melanadenia* (Myrtales: Myrtaceae) sobre *Blattella germanica* (Diptera: Blattellidae). Rev CENIC Ciencias Químicas. 2004; 35:132-34
33. **Leyva M, Aguilera L, Tacoronte J, Montada D, Bello A, Marquetti MC.** Estudio de laboratorio del aceite esencial de *Pimenta racemosa* (Myrtales: Myrtaceae) y su posible utilización para el control de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) Rev CENIC Ciencias Biológicas, 2007; 38:123-28
34. **Leyva M, Tacoronte JE, Marquetti MC.** Composición química del aceite esencial de *Pimenta racemosa* (Myrtales: Myrtaceae) sobre *Blattella germanica* (Diptera: Blattellidae). Rev Cub Med Trop 2007; 59. Disponible en <http://blue/bvsl/rcmt/2007/v59n2/mtr12207.htm>
35. **Leyva M, Tacoronte JE, Marquetti MC, Scull R, Montada D, Rodríguez Y, et al.** Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas en larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Rev Cub Med Trop 2008; 60:78-82.
36. **Normal Ramal.** NRSP-309 "Medicamentos de origen vegetal. Droga cruda. Métodos de ensayo". Cuba 1992
37. **OMS.** Instrucciones para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas en larvas de mosquito. WHO/VBC/81.807
38. **Raymod M.** Presentation d'un programme d'analyse log-probit pacer micro-ordenateur. Cah. ORSTOM. Ser Ento Med Parasitol 1985; 22:117-21.
39. **Isman M.** Plant essential oil for pest and disease management. Crop Prot 2000; 19:603-08
40. **Coria C, Almiron W, Valladares G, Carpinella C, Ludueña F, Defago M, et al.** Larvicida and oviposition deterrent effects of fruit and leaf ext from *Melia azedarach* (L) on *Aedes aegypti* (L) (Diptera: Culicidae) Bioresour Technol 2008; 99:3066-70
41. **Lee S, Tsao R, Peterson C, Coats JR.** Insecticidal activity of monoterpenoids to western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae), and house fly (Diptera: Muscidae). J Econ Entomol 1997; 90:883-92
42. **Traboulsi AF, El-Haj S, Tueni M, Taoubi K, Nader NA Mrad A.** Repellency and toxicity of aromatic plants extracts against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae) Pest Manag Sci 2005; 61:697-604
43. **Samarasekera R, Werasinghe IS, Hemalal KP.** Insecticidal activity of menthol derivatives against mosquitoes. Pest Manag Sci 2008; 64:290-5
44. **Cheng SS, Liu JY, Tsai KH, Chen WJ, Chang ST.** Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances J Agric Food Chem 2004; 52:4395-4000
45. **Marquis, RJ.** Herbivore fauna of *Piper* (Piperaceae) in a Costa Rican wet forest: Diversity, specificity, and impact. En: Price PW, Lewinsohn TM, Fernández GW & Benson WW (eds.). Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions. 1991. J. Wiley and Sons. Estados Unidos 1991. pp. 177-199.
46. **Bernard CB, Krishnamurty HG, Chauret D, Durst T, Philogène BJ, Sánchez-Vindas I, et al.** Insecticidal defenses of *Piperaceae* from the neotropics. J Chem Ecol 1995; 21:801-8
47. **Ivbijaro MF, Bolaji OO.** Effects of cypermethrin + dimethoate and extracts of *P. guineense* and *Azadirachta indica* on the pests and yield of cowpea, *Vigna unguiculata*. J Agric Sci 1990; 115:227-231.
48. **Miyakado M, Nakayama I, Ohno N.** Insecticidal unsaturated isobutylamides: From natural products to agrochemical leads. En: Arnason JT, Philogène BJ, Morand P. (eds.). Insecticides of Plant Origin. ACS Symposium Series 387, New York: American Chemical Society; 1989. pp. 183-187.
49. **Schultes RF.** De Plantis Toxicariis e Mundo Novo Commentationes XXVI. Ethnopharmacological notes on the flora of northwestern South America. Bot Mus Leaf Harv Univ 1980; 28:1-45
50. **Chansang U, Zahiri NS, Bansiddhi J, Boonruad T, Thongsrirak P, Mingmuang J, et al.** Mosquito larvicidal activity of aqueous extracts of long pepper (*Piper retrofractum*) from Thailand. J Vector Ecol 2005; 30:195-200
51. **Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja PA.** Phytochemistry of the genus *Piper*. Phytochemistry 1997; 46:597-673.
52. **Soberon G, Rojas C, Saavedra J, Kato M, Delgado G** Acción biocida de plantas de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) Rev Peru Biol 2006;13:107-12.
53. **Pino JA, Marbot R, Bello A, Urquiola A.** Essential Oils of *Piper peltata* (L.) Miq. and *Piper aduncum* L. from Cuba. J Essent Oil Res 2004; 16:124-126.
54. **Smith RM, Kassim H.** The essential oil of *Piper adun-*

Aceites esenciales como larvicidas de *Ae. aegypti*

- cum* from Fiji. New Zealand J Sci 1979; 22:127-128.
55. **Bottia E, Díaz O, Mendivelso D, Martínez J, Stashenko E.** Comparación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de cuatro plantas de la familia *Piperaceae* obtenidos por destilación-extracción simultánea. *Scientia et Technica* 2007;13:913-18.
 56. **E/INCB/2002/4** Disponible en http://www.incb.org/pdf/s/tr/pre/2002/precursors_2002_3b_4_es.pdf
 57. **Pérez-Pacheco R, Rodríguez-Hernández C, Lara-Reyna J, Montes-Belmont R, Ramírez-Valverde G.** Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) *Acta Zool Mex* 2004; 20:141-152.
 58. **Suparvarn P, Knapp F, Sigafus R.** Biologically active plant extracts for control of mosquito larvae. *Mosq News* 1974; 34:398-402
 59. **Gillij YG, Gleiser RM, Zygadlo JA.** Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresour Technol* 2008; 99:2501-15
 60. **Park IK, Choi KS, Kim DH, Choi IH, Kim LS, Bak WC, et al.** Fumigant activity of plant essential oils and components from horseradish (*Armoracia rusticana*), anise (*Pimpinella anisum*) and garlic (*Allium sativum*) oils against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). *Pest Manag Sci* 2006; 62:723-8.
 61. **Broussalis AM, Ferraro GE, Martino VS, Pinzón R, Coussio JD, Alvarez JC.** Argentine plants as potential source of insecticidal compounds. *J Ethnopharmacol* 1999; 67:219-23
 62. **Bostanian N, Akalach M, Chiasson H.** Effects of a *Chenopodium* based botanical insecticida/acaricide on *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) and *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Braconidae). *Pest Manag Sci* 2005; 61:979-984.
 63. **Silva WJ, Dória GA, Maia RT, Nunes RS, Carvalho GA, Blank AF, et al.** Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresour Technol* 2008; 99:3251-5.
 64. **Kordali S, Cakir A, Ozer H, Cakmakci R, Kesdek M, Mete E.** Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresour Technol* 2008; 99:8788-95
 65. **Yang YC, Lee SG, Lee HK, Kim MK, Lee SH, Lee HS.** A piperidine amide extracted from *Piper longum* fruit shows activity against *Aedes aegypti* mosquito larvae *J Agric Food Chem* 2002; 19:3765-7.